

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-069972

(43) Date of publication of application : 07.03.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A61K 31/70

A61K 35/76

A61K 48/00

(21)Application number : 10-244755

(71)Applicant : AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL

(22)Date of filing : 31.08.1998

(72)Inventor : TAHIRA KAZUMASA

OKAWA ATSUSHI

KOSEKI SHIORI

(54) EXPRESSION SYSTEM FOR FUNCTIONAL NUCLEIC ACID TRANSCRIPTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new ribozyme which contains a nucleotide sequence which has a specific base sequence, specifically cleaves targets such as HIV-1 RNA, and is useful, for example, for preventing and treating, as an antiviral agent, the acquired immunological deficiency syndrome.

SOLUTION: This is a new ribozyme which contains a nucleotide sequence which has a specific base sequence shown by formula I or II, can specifically cleaves target RNAs such as HIV-1 RNA, and is useful, for example, for preventing and treating the acquired immunological deficiency syndrome, for example, as an antiviral agent. This ribozyme was obtained by designing a plurality of ribozymes which have the same ribozyme sequence which initiates the transcription by a tRNAval promoter which is a pol III promoter; examining parameters which determine the in vivo activity of a ribozyme, followed by selecting the ribozyme sequence considering its in vitro stability and posttranscriptional activity.

5' - ACCGEGGNNPCCCTACGTCAGCGGTAACACG
TGGCCCAACACCGCAAGTCCCGCGTCTCAGACCGCAGACAAACAC
AACACGCAACAACTCCCAAGGCGCGAAGTACCTCTCAATAGGCT
im 2'

5' -ACCTTGGGTTTCTGAGTGTAGTGTATGACG-
TTCGCGGAACACGCGAAGGTCCTCCGTTCCAAACCCGCACTGACAAAC-
AAGACACAAACCTCGTACAGTACCGAATGCTTCAACGACGACGCTCGAA
ACGGGTTT-3'

T

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

31.08.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

2990268

[Date of registration]

15.10.1999

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-69972
(P2000-69972A)

(43)公開日 平成12年3月7日(2000.3.7)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/70	A D Y	A 6 1 K 31/70	A D Y 4 C 0 8 4
35/76		35/76	4 C 0 8 6
48/00	A B D	48/00	A B D 4 C 0 8 7

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 26 頁)

(21)出願番号 特願平10-244755

(22)出願日 平成10年8月31日(1998.8.31)

(71)出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72)発明者 多比良 和誠

茨城県つくば市東1-1-4 工業技術院

産業技術融合領域研究所内

(72)発明者 大川 淳

茨城県つくば市東1-1-4 工業技術院

産業技術融合領域研究所内

(74)指定代理人 220000415

工業技術院産業技術融合領域研究所長

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 機能性核酸転写用発現系

(57)【要約】

【課題】 新規なりボザイムおよびその発現系の提供。

【解決手段】 下記の塩基配列(I) または(II)を持つヌクレオチド配列を含むリボザイム。

塩基配列(I): 5'-ACCGUUGGUUUCGUGAGUGAGUGGUUUAUCAGU
UUGCCUAAACACGGGAAAGGUCCCGGUUUCGAAACCGGGCACUACAAACAC
AACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCCGAAACGGUUU
UU-3'塩基配列(II): 5'-ACCGUUGGUUUCGUGAGUGAGUGGUUUAUCAG
UUGCCUAAACACGGGAAAGGUCCCGGUUUCGAAACCGGGCACUACAAAC
AACACACAAACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCCGAA
ACGGUUUUU-3'

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の塩基配列(I) または(II)を持つヌクレオチド配列を含むリボザイム。

塩基配列(I): 5'-ACCGUUGUUUCCGUGAGUGUAGUUGUUUACGUCGCUUACACCGGAAAGGUGCCCGUUGCGAAACGGGACUACAACACAAACAGUAGAGCGGAAAGGUGCGAAACGGGACGUCGGAACGGUUU-3'

塩基配列(II): 5'-ACCGUUGUUUCCGUGAGUGUAGUUGUUUACGUCGCUUACACCGGAAAGGUGCCCGUUGCGAAACGGGACUACAACAAACACACAGUAGAGCGGAAAGGUGCGAAACGGGACGUCGGAACGGUUU-3'

【請求項2】 請求項1記載のリボザイムをコードするDNAを含む発現ベクター。

【請求項3】 請求項1記載のリボザイムをコードするDNAを含む発現ベクター-DNAを鋳型として、RNAに転写することを特徴とする、請求項1記載のリボザイムの製造方法。

【請求項4】 請求項1記載のリボザイムまたは請求項2記載の発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項5】 後天性免疫不全症候群を予防および/または治療するための請求項4記載の医薬組成物。

【請求項6】 請求項1記載のリボザイムを用いて、標的RNAを特異的に切断する方法。

【請求項7】 標的RNAがHIV-1 RNAである請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はリボザイムおよびその発現系に関する。

【0002】

【従来の技術】ハンマーヘッドリボザイムは、最も小さい触媒性RNA分子の1つである(Krugerら, 1982; Gruerier-Takada, 1983)。このリボザイムはサイズが小さく、また抗ウイルス剤として可能性があるため、作用機構の研究(DahmおよびUhlenbech, 1991; Dahmら, 1993; EcksteinおよびLilley, 1996; Pontiusら, 1997; Lottrら, 1998; Zhouら, 1996, 1997; ZhouおよびTaira, 1998)およびin vivoにおける利用を目指す研究(EricksonおよびZant, 1992; Murray, 1992; Rossi, 1995; EcksteinおよびLilley, 1996; Prieselら, 1997; Turner, 1997; Scanlon, 1997)が多数なされてきた。異なる生物における遺伝子発現抑制のためのリボザイムの使用を目指して成功した実験が多数報告されている(Sarverら, 1990; Dropulicら, 1992; Ojwangら, 1992; Yuら, 1993; ZhaoおよびPick, 1993; Inokuchiら, 1994; Yamadaら, 1994; Ferbeyreら, 1996; Fujitaら, 1997; Kawasakiら, 1998)。しかし、in vitroにおけるリボザイムの効力はin vivoにおける機能的活性と必ずしも相関していない。このin vivoにおける非有効性の理由のいくつ

かは以下の通りである。i) 細胞性タンパク質がリボザイムの標的RNAへの結合を阻害する、またはリボザイムの活性なコンホメーションを破壊する可能性がある; ii) リボザイムによって媒介される切断によって不可欠な金属イオンの細胞内濃度が機能的活性に十分でないかもしれない; iii) リボザイムはRNaseによって容易に攻撃される。しかし、リボザイムのin vivo活性を決定するパラメーターが現在解明されつつある(BertrandおよびRossi, 1996; Bertrandら, 1997; Gebhardら, 1997)。in vivoでの研究は、効果的なリボザイム媒介遺伝子不活性化にとって以下の因子が重要であることを示唆した。すなわち、高レベルのリボザイム発現(Yuら, 1993); リボザイムの細胞内安定性(RossiおよびSarver, 1990; EcksteinおよびLilley, 1996); 同一細胞コンパートメント(compartment)内におけるリボザイムとその標的RNAの共局在(SullengerおよびCech, 1993; Bertrandら, 1997); および転写されたリボザイムの切断活性(Thompsonら, 1995)である。最近、これらの種々の特徴は、用いられた発現系に依存することがわかった(Bertrandら, 1997)。

【0003】 mRNA分子の転写のために用いられるRNAポリメラーゼII (pol II)系およびmRNA、snRNA等の小さいRNA分子の転写のために用いられるポリメラーゼIII (pol III)系が、リボザイム発現系として使用されてきた(Turner, 1997)。pol IIプロモーターによって転写が開始された転写物は、コード領域の他に3'末端および5'末端に余分な配列を有する(例えば、非翻訳領域、キャップ構造、およびポリAテイル)。これらの余分な配列はin vivoにおける安定性およびmRNAとしての機能的認識に不可欠である。これらの配列が転写後トリミングされない限り、pol IIプロモーターによって転写が開始されたリボザイム配列を含む転写物は、これらの配列をすべて含んでいる(Tairaら, 1991; Ohkawaら, 1993)。その結果、ある場合には、リボザイムがその機能的認識する部位が、例えばコード配列の一部によって覆われてしまうことがある。対照的に、pol III系は短いRNA分子の発現に適しており、余分な配列は非常に短いものが生成されるのみである。さらに、発現レベルは少なくとも一桁、pol II系のそれよりも高い(GottenおよびBirnsteil, 1989)。したがって、pol III系はリボザイムの発現に非常に有用であろうと示唆された(Yuら, 1993; Perrimanら, 1995)。しかし、多くの場合、pol III系の明らかに望ましい特徴にもかかわらず、リボザイムの期待される効果は達成されなかった(Illvesら, 1996; Bertrandら, 1997)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、pol IIプロモーターであるtRNA^{val}プロモーターによって転写が開始される、同一のリボザイム配列を有する3種類のリボザイムを設計し、リボザイムのin vivo活性を

決定するパラメーターを検討したところ、転写物 (tRNA^{Val}) プロモーターの配列が付加されたリボザイム (以下、「tRNA^{Val}-リボザイム」と称する。)) の全体的な構造がリボザイムの切断活性ばかりでなく細胞内半減期をも決定することを明らかにした。細胞核において転写されたすべてのキメラ tRNA^{Val}-リボザイムは細胞質に輸送され、かくして、リボザイムとその標的は同じ細胞コンパートメント内に存在した。このような条件下で、本発明者らは各 tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内半減期および正常レベルが *in vivo* における機能的活性の主要な決定要素であることを見いだした。さらに、本発明者らは、*in vivo* において最長の半減期をもつように特に設計したリボザイムを発現する細胞が HIV-1 の攻撃に対してほぼ完全に耐性であることを示した。すなわち、本発明は、下記の塩基配列 (I) または (II) を持つヌクレオチド配列を含むリボザイムを提供する。

【0005】塩基配列 (I): 5'-ACCGUUGUUCGUGAGUGUAGUUGUUAUACCGUACCGUACCGGAAAGGUGCCGGUUGCAAAACCGGGCACUACAACACCAACACUGAGAGGACCGAAAGGUGCCGAAACCGGACGUCGAAACCGUUUUU-3' (配列番号 1)

塩基配列 (II): 5'-ACCGUUGUUCGUGAGUAGUUGUUAUACCGUUGCCGUAACACCGGAAAGGUGCCGGUUGCAAAACCGGACUACAACACCAACACUGAGAGGACCGAAAGGUGCCGACGUCGGAACCGGUUUUU-3' (配列番号 2)

【0006】また、本発明は、上記のリボザイムをコードする DNA を含むベクターを提供する。さらに、本発明は、上記のリボザイムをコードする DNA を含む発現ベクター-DNA を鋳型として、RNA に転写することと特徴とする、リボザイムの製造方法を提供する。さらにまた、本発明は、上記のリボザイムまたは発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、後天性免疫不全症候群を予防および/または治療するのに有効である。本発明はまた、上記のリボザイムを用いて、標的 RNA を特異的に切断する方法を提供する。標的 RNA としては、HIV-1 RNA が効果的である。

【0007】

【発明の実施の形態】我々はリボザイムの転写量や安定性、転写後の活性を考慮し、その発現系として、ポリメラーゼ III 系であるヒトの tRNA^{Val} プロモーターを選択し、リボザイムとこのプロモーターとのつながりによって生体内におけるリボザイム効果に差がでないかを検討した。すなわち、生体内において有意なリボザイム効果を得るために重要な要因の一つである、細胞内での安定性、及び転写後の活性に着目し、リボザイムの高次構造とこれらの要因との相関性について明らかにすることを目的とした。

【0008】まず、HIV-1 の比較的確率設計した配列を標的とするハンマーヘッド型リボザイムを設計し、その遺伝子を様々な配列を介して tRNA^{Val} プロモーター

の下流につなぐことにより 4 種の発現系を構築した。この発現系を構築するためのベクターとしては、pUC19 (Takara) を用いたが、その他にも、pGREEN LANTERN (ライフテックオリエンタル株式会社製)、pHAMDR (HUMAN GENE THERAPY 6:905-915 (July 1995)) などのベクターを用いてもよい。また、発現系の構築に必要なオリゴヌクレオチドは、DNA/RNA 合成機 (モデル 394; Applied Biosystems, Division of Perkin Elmer Co. (ABI), Foster City, CA) で化学合成することができる。

【0009】Zuker 法を用いた予測から、tRNA^{Val} プロモーターとハンマーヘッド型リボザイムのつながり目の配列の違いはリボザイムの認識部位における 2 次構造に大きな影響を与えたと考えられた (図 1 参照)。この予測図によると、全体的なリボザイムの 2 次構造はどれもほぼ同じであるのに対し、基質の結合部位における自由度は大きく異なっていることがわかる。Rz 1 は基質結合部位の両方が分子内でステム構造を形成しているのに対し、Rz 2 では片方が、Rz 3 においては両方の結合部位がきれいにちょうど外側へ突出していることがわかる。Rz 3 においては突出した基質結合部位がタンパク質に覆われてしまう恐れもあるが、リボザイムは RNA 酵素であり、基質との結合しやすさ、解離のしやすさと同時に活性における重要な因子となるため、リボザイムの切断能力としてはこれが一番であることが予測された。実際、細胞内において転写されたリボザイムを用いて *in vitro* の系において [40mM Tris-Cl (pH8.0), 8mM MgCl₂, 5mM DTT, 2mM Spermidine, 2 U/μl RNase inhibitor, 30 μg total RNA] の条件下で反応を行った。この際 total RNA 中に含まれるリボザイムの含有量は一定に揃えた。In vitro で転写し、放射ラベルした短い基質に対するリボザイムの活性はその認識部位における自由度に依存する結果となった (図 2 参照)。また、リボザイムの安定性についても検討した。対照となる遺伝子の発現量を一定に揃え、それぞれのリボザイム量を比較検討した。リボザイムの構造における違いは安定性にも影響を与えており、“なぜ全体的にはそれほど差のない構造がどのように影響するのか”理由は明らかではないが、最も安定なものとそうでないものは約 25 倍もの差を示した (図 3 B 参照)。

【0010】先にも述べたように、いまだ不明である *in vitro* の系におけるリボザイムの活性と生体内における効果との相関性についても次に検討した。まず、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、これと pHL4-3 (HIV-1 のクローン) の配列の融合遺伝子に対してリボザイムを作用させ、細胞抽出液内のルシフェラーゼ活性を測定することで間接的に細胞内におけるリボザイム効果を評価する系を構築した (図 3 A 参照)。それぞれのリボザイムについて比較して結果、細胞内で安定性の最も高かったものが最も高活性を示したことから、安定性がいかに重要であるかが示唆された (図 4 参

照)。

【0011】ここまでの話は培養細胞内においてルシフェラーゼ遺伝子とHIV-1の配列との人工的な融合遺伝子に対するリボザイム効果の評価となるので、結局のところ、実際の生体内における結果と等しいと判断することは困難である。そこで、実際のHIV-1に対するリボザイム効果の評価を行った(図5参照)。リボザイム発現系の質転換体にHIV-1を感染させ、ウイルスの増殖を血清中におけるp24(ウイルスのコアタンパク)の生産量を測定したところ、我々の培養細胞内における評価と同様な傾向を示す結果が得られた。またin vitroで最も安定性の高かったリボザイムはこの場合においても非常に高い抑制効果を示し、p24の生産を99%抑えていることが明らかとなった(図6C参照)。一方、in vitroで切断活性の最も高かったリボザイム発現系はウイルスの増殖をほとんど抑制することができなかった。

【0012】このように、ウイルスでのリボザイム効果の評価も培養細胞内における人工的な基質における評価と同傾向を示していることが明らかになった。よって、今回我々が行ったような一過的な評価における結果も、生体内におけるリボザイム効果のおよそその目安になると考えられる。またin vitroからウイルスを扱った実験にわたる結果から、リボザイムの細胞内における有意な効果を得るためには活性の高さも大事であるが、それにも増して細胞内における安定性が重要であることが明らかとなった。今回のようにほとんど配列に違いのないリボザイムにおいても、発現系とのつなぎ方一つで、先に述べたような生体内における効果に大きな差が生じるという事実は、これについても十分考慮する必要がある、また発現させるために付加した配列による高次構造の影響も加味し、リボザイムに安定性を持たせるような設計が重要であることが示唆された。

【0013】本発明の tRNA^{val} -リボザイムを用いて、標的RNA、特にHIV-1 RNAを特異的に切断することができる。本発明の tRNA^{val} -リボザイムは、医薬、特に、後天性免疫不全症候群を予防および/または治療するための医薬として使用することができる。例えば、本発明の tRNA^{val} -リボザイムをリボソームに封入し、これを生体に投与して、HIVを含む細胞に取り込ませることにより、HIVの転写を阻害することができる。また、本発明の tRNA^{val} -リボザイムをコードするDNAをウイルスなどのベクターに組み込んで、HIVを含む細胞内に導入し、該細胞内でのベクターを発現させ、本発明の tRNA^{val} -リボザイムを産生させることにより、HIVの転写を阻害することができる。本発明の tRNA^{val} -リボザイムの投与は、疾病の重症度や生体の応答性などによるが、予防および/または治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

【0014】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに具体的に説明する。本発明の範囲は、これらの実施例に限定されることはない。

〔実施例〕

材料および方法、

プラスミドの構築、

各 tRNA^{val} -リボザイムを発現するプラスミド(pUCdt-Rzシリーズ)は以下のように構築した。すなわち、ヒト胎盤 tRNA^{val} 遺伝子(pHtV1; Arnoldら, 1986)に由来するプロモーター領域の配列をコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーをアニールし、pUC19のEcoRI/SalI部位に連結した。オリゴヌクレオチドリンカーの配列は以下の通りであった：センス5'-aattcca gga cta gtc ttt tag gtc aaa aag aag aag ctt tgt aac cgt tgg ttt ccgtag tgt agt ggt tat c ac gtt cgc cta aca cgc gaa agg tcc ccg gtt cga ag-3' (配列番号6)；アンチセンス5'-tcg act cgt aac cgg gga cct ttc ggc tgt tag ggc aac gtc ata acc ac t aca cta cgc aaa cca acg gtt aca aag ctt ctt ctt ctt ttt gac cta aaa gac tag tcc tgg-3' (配列番号7)。次に、ターミネーター配列をコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーをアニールし、プロモーター領域の配列を含むpUC19のNspV/SalI部位に連結した。オリゴヌクレオチドリンカーの配列は以下の通りであった：センス5'-cga aac cgg cga cc c ggg gaa tat aac ctc gag cgc ttt ttt tct atc ggc tc-3' (配列番号8)；アンチセンス5'-tcg aac cga tag aaa aaa agc gct cga ggttat att ccc ggc gtc ccc ggt ttc-3' (配列番号9)。得られたプラスミド(これは tRNA^{val} のAおよびBボックス、ならびにターミネーターを含んでいた)をpUCdtと名付けた。

【0015】pUCdtを鋳型とし、アッパープライマー(5'-cgc cag ggt ttc cca gtc acg ac-3') (配列番号1)およびリボザイムとターミネーター両方の配列を含むローアプライマー(Rz1、5'-ctg cag gtc gac cgc ata gaa aaa aag cgc tgc aggtgc ccc ttt cgt cct c ac gga ctc atc agt gtt gtc tgg gtc ccc ggt ttc gaa ccc gga cct tt-3') (配列番号11)；Rz2、5'-ct g cag gtc gac cgc atagaa aaa aac gtc ttc cga cgt g cc cgt ttc agt cct ttc gct cct cat cag tgt tgt t gtt agt gcc cgg ttt cga acc ggg gac ctt t-3' (配列番号12)；Rz3、5'-ctg cag gtc gac gac ata g aaa aac cgt ttc cga cgt gcc cgt ttc gct cct cat cag tgt tgt gtc ttt gtt agt gcc cgt ttc gga acc ggg gac ctt t-3' (配列番号13)を用いて、各リボザイムおよび tRNA^{val} 部分の配列をコードするDNA断片をPCRによって増幅した。PCR産物をEcoRIおよびSalIで消化した後、各断片をpUC19のEcoRI/SalI部位に連結し、pUCdt-Rzを得た。pUCdt、およびpUCdt-R

zシリーズの配列を直接クレンジド配列決定によって確認した。tRNA^{Val}-リボザイム遺伝子に加え参照遺伝子発現カセットを含む pUC-Rzシリーズのメンバー(図3A参照)は、pUCd⁺のPvuII 断片を各pUCd-RzのHincII部位に挿入することによって構築した。制限酵素による消化によって挿入断片の方向を確認した。リボザイム導入HeLa細胞の作製に用いたpUlyd-Rzシリーズは、pUCd-Rzシリーズの各PvuII-SalI断片をpUlyd (Yatesら, 1984)のEcoRV/SalI部位に挿入することによって構築した。オリゴヌクレオチドリンカーおよびPCRプライマーのすべては、DNA/RNA合成機(392型; PE Applied Biosystems, Foster市, CA)を用いて合成した。

【0016】組換えHIVベクタープラスミドは以下のようになら構築した。すなわち、pMCl neo由来の細菌性neo^r遺伝子カセットをコードする2.0 kbのBamHI断片(ThomasおよびCapecci, 1987)を、HIV-1由来ベクターのSalI部位に挿入した(図5A; Shimadaら, 1991)。次に、図5Bに示すように、tRNA^{Val}-リボザイム発現カセットをTK-neo^rのすぐ上流でSalI部位にクローニングした。

【0017】細胞の培養およびトランスフェクション。HeLaおよびCos細胞は、10% (v/v) ウシ胎児血清(FBS; Gibco BRL)および45 μ g/ml ゲンタマイシン(Gibco BRL)を添加したダルベッコ改良イーグル培地(DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD)で培養した。リボザイム導入細胞を選択するため、ハイドロマイシンBを最終濃度300 μ g/mlで用いた。H9細胞は、10% ウシ胎児血清(FCS; Gibco BRL)を添加したRPMI (Gibco BRL)で培養した。

【0018】リボフェクション試薬(Gibco BRL)を製造者のプロトコールにしたがって用いて、細胞をトランスフェクトした。H9細胞のトランスフェクションは、組換えHIV-1ベクタープラスミド(図5BのHIVRb.N)を用いてCaPO₄共沈法により実施した。

【0019】RNAの調製。グアニジニウムチオシアネートフェノールクロロホルム法により全RNAを抽出した。細胞質RNAおよび核RNAを文獻(HuangおよびCarmichael, 1996)に記述された通り分離した。

【0020】リボザイムの定常レベルおよび半減期の測定。各リボザイムの定常レベルの測定は以下のように実施した。

すなわち、各pUC-Rzを用いてHeLa細胞(1x10⁶細胞/10 cm²プレート)をトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、これらの細胞から全RNAを単離した。単離された全RNAのtRNA^{Val}-リボザイムの下流に位置する対照RNAの量を、対照RNAに特異的なプローブ(5'-aaa tgc cta aaa ggc ctc gag gtt atg ctc ccc ggg t-3') (配列番号14)を用いたノーザンブロット分析でまず定量した。各サンプル中の対照RNAの量を一定値に維持した。また、全RNAの

レベルも、必要であればトランスフェクトされていないHeLa細胞から単離したRNAを添加することにより一定に保った。最後に、リボザイムに特異的なアプローブ(5'-ctc atc tgc gtt gtc t-3') (配列番号15)または対照RNAに特異的なアプローブを用いてハイブリダイゼーションを繰り返した(図3B)。

【0021】各リボザイムの半減期は、細胞を文獻(HuangおよびCarmichael, 1996)に記述された通りアクチノマイシンDで処理した後、ノーザンブロット分析によって測定した。すなわち、細胞をアクチノマイシンDに最終濃度5 μ l/mlで0、60、120または180分間さらし、各時点で全RNAを単離した(図3C)。単離されたRNAの各調製物中のリボザイムの量をノーザンブロット分析により測定した。

【0022】切断アッセイ。各pUCd-RzまたはpUCd⁺によってトランスフェクトされたHeLa細胞から全RNAを抽出した。単離されたRNAの各調製物中のリボザイムの量を、リボザイムに特異的なアプローブを用いたノーザンブロット分析により測定した。次に、トランスフェクトされていないHeLa細胞から単離したRNAを添加することにより各リボザイムの濃度を同じ値になるように調節した。HIV-1のU5 LTR領域をコードする基質RNA(図2A)を77転写によって調製し、³²Pを用いて放射標識した。50 μ lの反応混合物[40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 5 mM ジチオトトレイト(DTT), 2 mM スペルミジン, 40 Uの胎盤RNaseインヒビター, 30 μ lの全RNA, 5 kpcの放射標識した基質RNA]中で37°Cで12時間間断反応を進行させた。6%ポリアクリルアミドゲルM原液ゲルを用いた電気泳動にかけて反応生成物を同定した(図2B)。

【0023】ルシフェラーゼアッセイ。Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, Madison, WI)を製造者のプロトコールにしたがって用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。pUCd-Rzおよび標的発現プラスミドによってトランスフェクトされたHeLa細胞(図4A)、または標的発現プラスミドによって形質導入されたリボザイム産生HeLa細胞(図4B)を150 μ lの1x 受動溶解緩衝液中で15分間溶解し、プレートからこすり取った。遠心分離によって細胞破砕物を除去した。20 μ lの遠心分離した溶解物を100 μ lのルシフェラーゼアッセイ試薬IIに添加した後、発光計(luminometer) (Luminant LB 9501; Berthold, Bad Wildbad, Germany)を用いて発光シグナルを直ちに定量化した。さらに、ホタルルシフェラーゼの活性を標準化するため、我々はホタルルシフェラーゼによって触媒された反応の定量化の直後に100 μ lのStop & Glo[®]試薬をサンプルチューブに加えることによって、ウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼによって生成された発光シグナルを測定した。ウミシイタケルシフェラーゼの活性を参照して、ホタルルシフェラーゼ活性の記録された数値を標準化し

た(図4)。ホタルシフェラーゼ活性の標準化した各数値を、溶解物中のタンパク質濃度を参照してさらに標準化した。タンパク質はブラッドフォード法(Bradford's method)に基づくProtein Assay Kit (Bio-Rad, California, USA)を用いて定量した。

【0024】リボザイムを安定に導入されたHeLa細胞 pHyg dtまたはpHyg dt-Rzシリーズのメンバーを用いてHeLa細胞をトランスフェクトし、300 μ g/mlのハイグロマイシンB(和光純薬、大阪、日本)を含有するDMEM中で選択することにより、リボザイム導入細胞を得た。トランスフェクションの12時間後に培地を増殖培地と交換し、細胞をさらに48時間培養した。細胞を1:5の希釈で、300 μ g/mlのハイグロマイシンBを含有するDMEM(選択培地)で継代培養した。培地は3日ごとに新鮮な培地と交換した。ハイグロマイシンBに耐性な細胞を、250 μ g/mlのハイグロマイシンBを含有するDMEM中で増殖させた。

【0025】ウイルスの作製およびHIVベクターによるリボザイムの導入。

組換えウイルスを含む上清を文獻(Shimada, 1991)に記述されるように作製した。すなわち、Cos細胞(2×10^6 細胞/10 cmの皿)を培養し、10 μ gのバックジェンズベクタープラスミドおよび10 μ gの組換えHIVベクタープラスミド(図5Bに示すHIVrib.N)を用いてトランスフェクトした。48時間後に組換えウイルスを含む上清を採取し、孔径0.22 μ mのフィルターでろ過した。次に、 2×10^6 個のH9細胞を、6 μ g/mlのPolybreneTM (Abbott Laboratories)を含むろ過した上清5 mlと共にインキュベートした。24時間後、培地を10%FCSおよび1 mg/ml G418を添加したRPMIと交換した。細胞をさらに48時間培養し、G418耐性クローンを単離した。RT-PCR分析によってリボザイム遺伝子の導入を確認した。

【0026】H9細胞中に産生されたtRNA^{Val}-リボザイムの定量

以下のように定量的RT-PCRを実施した(Iizawaら, 1990; HambletおよびCastora, 1995)。すなわち、リボザイムを安定に導入したH9細胞から全RNAを抽出した。20 μ lの反応混合物(1 μ gの全RNA、20 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、5 mM MgCl₂、1 mM dNTP、1 pmolのプライマー(βアクトニン用: 5'-gtggcc atc tct tgc tgc aa-3' (配列番号16); リボザイム用: 5'-gac ct t tgcgtc etc atc-3' (配列番号17))および0.25 U/ml モロニマウス白血球ウイルスRTase (宝酒造、京都、日本))中で42°Cで30分間cDNAを合成した。

【0027】2個のオリゴヌクレオチドプライマー(アッパー: 5'-gac tac etc atg aag atc ct-3' (配列番号18); ロア: 5'-gtg gcg atc tct tgc tgc aa-3' (配列番号19))を用いたPCRによりβアクトニンのcDNAを増幅した。PCRサイクルは、94°C 1分間、60°C 1分間および72°C 2分間を13、15または17サイクル

実施した。2個のオリゴヌクレオチドプライマー(アッパー: 5'-gtt atc acg ttc gcc taa-3' (配列番号20); ロア: 5'-gac ctt tgc tgc etc atc-3' (配列番号21))を用いたPCRによりリボザイムcDNAを増幅した。PCRサイクルは、94°C 1分間、55°C 1分間および72°C 2分間を13、15または17サイクル実施した。

【0028】13、15および17サイクル後のPCR産物を、リボザイムに特異的(5'-acg cgaagg gtc ccc ggt-3' (配列番号22))またはβアクトニンに特異的(5'-gc g ggaaga tgc tgc gtc a-3' (配列番号23))な放射標識プローブを用いたサザンブロッティングにより分析した。BAS2000 システム(富士フィルム、東京、日本)を用いて各バンドの放射能(図6Aおよび6B)を測定した。

【0029】HIV-1チャレンジアッセイ

HIVベクター(HIVrib.N)を用いてリボザイムを導入したH9細胞およびモックを導入した対照細胞をM432と共にm.o.i(感染多重度)0.01で4時間インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、これらの細胞を 1×10^6 細胞/mlの密度で、10% FCSを添加したRPMI 1640培地で培養した。ウイルス感染後3、7および11日に上清を回収した。HIV-1抗原捕獲ELISA テストキット(DAINABO T、東京、日本)を製造者の指示にしたがって用いて、各上清におけるHIV-1のp24 抗原のレベルを測定した。

【0030】結果

tRNA^{Val}-リボザイムの二次構造およびin vitroにおけるそれらの切断活性。

pol IIIによって転写が開始されるリボザイム発現カセットを構築するため、我々はHIV-1 RNAの5' リーダー配列を模倣とするリボザイム配列(Adachiら, 1986; Yuら, 1993)を、間に3つの短いリンカーを介して、tRNA^{Val}プロモーターに隣接してクローン化した(図1においてリンカー配列は小文字で、またリボザイム配列は太い大文字で示す)。一組のpUcdt-Rzプラスミドを得た。短いリンカーの挿入は、転写物の全体的構造を変化させ、その結果、リボザイムの認識アーム(arm)(図中、認識アームには下線を付している)の接近しやすさ(accessibility)に影響を及ぼした。当然ながら、リボザイムが基質RNAと共にステム(stem)構造(これは次におくる基質の切断を確実にするものである)を形成できるように、リボザイムの5' 側および3' 側基質認識部位の両方が基質に対して利用可能であることが重要である。構造と機能的活性の関係を明らかにするため、我々は認識アームの利用可能性(availability)の程度を変更するリンカーを選択した。図1はコンピュータモデリング(Mulford Biocomputing Office, Biology Department, Indiana University, IN, USA)によって予測されるtRNA^{Val}-リボザイムの二次構造(AおよびBボックス)に対応する配列に影響を及ぼす。ある場合

においては(図1A)、ターミネーター配列の前にリンカーが挿入され、リボザイムの3'側基質認識アームのフレキシビリティを制限した。さらに、5'側基質認識アームは利用不可能であった。したがってtRNA^{val}-リボザイム1(図1AのRz 1)の場合は、5'側および3'側基質認識アームの両方は殆どらせん構造中に埋没していた。tRNA^{val}-リボザイム2(Rz 2)は、5'側に制限された1つの基質認識アームを有する。対照的に、tRNA^{val}-リボザイム3(Rz 3)は制限された基質認識アームを全くもたず、両方のアームとも基質との結合に利用可能であった。基質認識アームのフレキシビリティから判断すると、Rz 3の切断活性が最も高く、次にRz 2およびRz 3がこの順番で続くと考えられる。なお、Rz 1~3の場合配列は、それぞれ、配列表の配列番号3、1、および2に示す。

【0031】上記リボザイムがそれらの二次構造(図1)から予想される通りの切断活性を有するかどうかを調べるため、我々はまずin vitroにおける活性を比較した。上記リボザイム(tRNA^{val}-リボザイム)をコードする種々のpUCdt-Rzプラスミドを用いてトランスフェクトしたHeLa細胞から全RNAを単離した。我々は単離したRNA中の各リボザイムの一定量(ノーザンブロット分析データに基づく)を放射標識した基質RNAと混合し、切断反応を開始させた。12時間インキュベートした後、6%ポリアクリルアミド/7M尿素を含むゲルを用いて各反応の進行をモニターした(図2)。予想した通り、両方の認識アームが利用可能であるRz 3の切断活性が最も高く、次にRz 2が続き、他方、両方の認識アームが利用できないRz 1の切断活性は非常に低かった。したがって、in vitroにおけるtRNA^{val}-リボザイムの切断活性は、コンピュータによって作製されたそれらの二次構造から推定できることが明らかであった。

【0032】tRNA^{val}-リボザイムの定常レベルおよび半減期

我々はリンカー配列の介在によって全体的な構造に小さい変化が生じるであろうと予想した。したがって、リンカーはリボザイムのin vivoにおける安定性にかんがりの影響を及ぼすに相違ない。我々は2つの異なるアプローチを用いて、各tRNA^{val}-リボザイムの細胞内安定性を下記のように比較した。すなわち、pUC-Rr(リボザイム)をコードする各pUCdt-Rzプラスミドに参照遺伝子の配列を付加してpUC-Rrを作製した(図3A)を用いて一過性にトランスフェクトしたHeLa細胞由来の各転写物の定常レベルをノーザンブロット分析(一過性発現アッセイ)により比較した。参照遺伝子の転写量を調整することにより各tRNA^{val}-リボザイムの発現レベルを標準化した。参照遺伝子は同じプラスミド内にタンデムに連結した(pUC-Rr; 図3A)。tRNA^{val}-リボザイムをコードする各プラスミドを用いてトランスフェクトしたHeLa細胞から我々が単離したRNAの全サンプル中に、

長さが約150ヌクレオチド(これはキメラtRNA^{val}-リボザイムの大さきと一致する)の転写物が検出された。tRNA^{val}-リボザイムの定常レベルは、濃度が30倍の範囲で異なっていた。最も高かったRz 2のレベルは最も低いRz 1のレベルの約26倍であった。そして、Rz 3のレベルはRz 1のレベルの約5倍であった。各リボザイム発現カセットのプロモーター領域には何の改変もしていないので各場合において転写効率は一であると推定されるため、我々は転写物の定常レベルにおけるこれらの差は各転写物のin vivoにおける安定性の結果であると仮定した。

【0033】第2のアプローチとして、また上記の仮説を試験するため、我々はより自然な細胞内条件下で各転写物の安定性を比較しようとした。我々は、各tRNA^{val}-リボザイムを産生する安定したHeLa形質転換細胞を確立し、そしてアクチノマイシンDを用いて細胞性転写を妨げることによって各転写物の細胞内半減期を直接測定した。図3Cに示すように、Rz 2の分解速度はRz 1およびRz 3のそれよりも低かった。Rz 2の半減期(100±10分)は、Rz 1(35±2分)およびRz 3(40±15分)の2倍以上であった。これらの結果は一過性発現アッセイの結果と良く一致しており、転写物の定常レベルにおける差は転写効率における何らかの差によるよりも、むしろ各転写物のin vivoにおける安定性による、という我々の仮説を支持した。

【0034】tRNA^{val}-リボザイムの細胞内活性
tRNA^{val}-リボザイムの細胞内活性を評価するため、我々は2種類のアッセイを実施した。第1に、各tRNA^{val}-リボザイム発現プラスミド(pUCdt-Rr)およびHIV-1 LTR (R-U5 領域)-ルシフェラーゼからなるキメラ遺伝子をコードする標的遺伝子発現プラスミドを用いてHeLa細胞を同時トランスフェクションした。両遺伝子の一過性発現の後、各細胞溶解物においてルシフェラーゼ活性を測定することにより各tRNA^{val}-リボザイムの細胞内活性を評価した。リボザイム発現プラスミドの代わりに最小限のtRNA^{val}プロモーターおよびターミネーター配列を有する対照プラスミド(pUCdt)を用いた場合に記録されたルシフェラーゼ活性を100%とした。図4Aに示すように、in vivoにおいて安定性が最も高かったRz 2が最も効果的(>60%抑制)であり、Rz 3が次に効果的(>40%抑制)であった。Rz 1は、in vitroにおける低い切断活性(図2B)およびin vivoにおける低い安定性(図3Bおよび3C)から予測されるように、非常に効果的とは言えなかった(約10%抑制)。

【0035】第2のアッセイにおいては、標的遺伝子発現プラスミドのみを用いて、ほぼ同一レベルのtRNA^{val}-リボザイムを発現する安定した形質転換細胞をトランスフェクトした(安定した形質転換HeLa細胞を意図的にヒックアップし、リボザイムをほぼ同一レベルで発現するクローンを試験用に選択した)。各リボザイムに対

して2つの独立した、安定な形質転換体を用いたこの実験において(図4B)、我々は上の段落に記述した傾向に類似した傾向を観察した。しかし、この場合は、おそらく形質転換HeLa細胞がもつRNA^{pol}-リボザイムを構成的に産生したため、すべてのリボザイムの効果はより強かった。Rz2は標的遺伝子の発現を有意なレベルまで抑制し、ある場合には97%も抑制した。

【0036】Rz3は*in vitro*における切断活性が最も高かったが、細胞環境内ではRz2より効果的に作用することではなかった。これらの結果は、もし転写されたリボザイムが細胞内で十分安定であるならば、極めて高い切断活性がなくても*in vivo*において顕著な効果をもたらすことを示唆する。

【0037】HIV-1の複製を抑制する能力。

上記の試験は、Rz2およびRz3が*in vivo*においてHIV-1の配列に対して有意な切断活性をもつかもしれないことを示したので、我々はHIV-1の複製を抑制するもつRNA^{pol}-リボザイムの能力を比較した。すなわち、HIVベクター(図5; Shimadaら, 1991)を用いて、Rz2またはRz3を発現するH9細胞系の安定な形質転換体を得た(上記の試験においてRz1は不活性だったので、Rz1を産生する安定な形質転換体を単離する試みは行なわなかった)。HIVベクターによって形質導入された、リボザイム発現カセットをもたない細胞(図5A)をモック対照として用いた。以下の分析には2つの独立した細胞系を用いた。その結果、11日間わたって、リボザイムを産生しない細胞の増殖速度(データはここに示していない)と比べ、それら細胞系の増殖速度に何ら明白な変化は検出されなかった。したがってリボザイムは宿主細胞にとって有害ではなく、おそらく高い特異性をもって標的RNAのみを切断したのであろう(Kawasakiら, 1996, 1998)。

【0038】ウイルスチャレンジアッセイに先立って、我々は定量的RT-PCR分析により形質導入H9細胞における各もつRNA^{pol}-リボザイムの定常レベルを測定した。図3Bに示すHeLa細胞を用いた一過性発現アッセイの結果、すなわち、Rz2とRz3の定常レベルの差は約5倍であるということが、RT-PCR分析により確認された(図6Aおよび6B)。明らかにRz2は*in vivo*においてRz3よりも安定であった。

【0039】もつRNA^{pol}-リボザイムを構成的に産生する安定なH9形質転換体を用いた一過性発現アッセイに先立って、感染の11日後に測定するとRz2は殆ど完全にウイルスの複製を抑制した(約99%) (図6C)。対照的に、驚くべきことに、Rz3はこれらの実験条件下でウイルスの複製を全く抑制しなかった。HIV-1チャレンジアッセイにおいては、Rz2とRz3の効果の差は顕著であった。

【0040】もつRNA^{pol}-リボザイムの細胞内局在
リボザイムがその標的と共局在することがリボザイム効

果の明らかに重要な決定要素であるので(SullengerおよびCech, 1993; Bertrandら, 1997)、もつRNA^{pol}-リボザイムの細胞内局在を確認することが不可欠であった。Rz2発現カセットによって形質導入されたHeLa細胞由来の全RNAを核画分および細胞質画分に分離した。次に、リボザイムに特異的なプローブを用いてノーザンブロット分析により転写されたRz2を検出した。図7Aに示すように、Rz2は主として細胞質画分に見いだされた。そして、核画分には有意なレベルで検出されなかった。他のもつRNA^{pol}-リボザイム(Rz1およびRz3)もまた細胞質画分に主として局在していた(データはここに示していない)。核内に残留するU6 snRNAは対照としてこれらの試験に含めた(図7B)。

【0041】考察。

リボザイムは特定の遺伝子の発現を抑制するための、可能性のある有用な道具である。なぜなら、リボザイムは高い特異性をもって他のRNA分子に作用するように作製できるからである(Uhlenbeck, 1987; HasseloffおよびGerlach, 1988)。多数の試みが成功をおさめたが(BeksteinおよびLilley, 1996; Turner, 1997; Seaton, 1997)、*in vivo*において使用できる効果的なリボザイム発現系を設計することは依然として困難である。治療剤または遺伝子作用物質としてのリボザイムおよびアンチセンスRNAの使用に関連する1つの主要な挑戦は、適切な発現システムの開発である(JenningsおよびMolloy, 1987; Sullengerら, 1990; Bertrandら, 1994, 1997; Thompsonら, 1995)。序論に述べたように、今日まで2種類の発現系、すなわちpol II系およびpol III系が用いられてきた。本研究において、我々はpol III系およびリボザイムの転写のためにヒトもつRNA^{pol}遺伝子のプロモーター(Yuら, 1993)を用いた。このプロモーターは小さいRNA分子の転写に適しているばかりでなく、その使用はコンピュータフォールディング(folding)による二次構造の予測を容易にする。より重要なことに、それは転写されたリボザイムの核から細胞質への輸送を可能とし、その結果もつRNA^{pol}-リボザイムは標的mRNAを見つけることができるのである。

【0042】発現カセットの設計。

標的mRNAの二次構造は、リボザイムによって媒介される切断を受けやすいかどうかを決定する。そして、リボザイムもまた最大活性を得るためには適切な二次および三次構造に折り畳まれなければならない。コンピュータが予測する二次構造が転写後の対応する構造を本当に表しているという保証は全くないが、本研究において予測された構造(図1A~1C)は、*in vitro*における切断活性と良く相関していた(図2)。発現カセットにおいては、転写物の3'末端プロセッシングをブロックするため、成熟もつRNA^{pol}(図1Eに大文字で示す)の最後の7個の塩基が除去されたが転写に何ら影響はなかつ

た (Adeniyi-Jonesら, 1984)。これらの塩基をリンカー (図1に小文字で示す) によって置換し、その後リボザイム (太い大文字) をつけた。リンカー配列によって tRNA^{Val} の配列 (全配列の約2/3を) と組み合わせ安定なステム構造を形成することにより、基質認識アームの自由度または利用可能性を調節した。したがって、コンピュータフォールディングによって各認識アームの二次構造および接近可能性を予測することは比較的容易であった。さらに、基質認識アームの配列が変わっても、全体的二次構造を予測する同じルールを用いる限り、認識アームの接近可能性を予測することは可能である。実際、我々は他の遺伝子の発現を抑制するための類似のリボザイム発現系の構築に成功した (Kawasakiら, 1996, 1998)。図1A~1Cに示す我々の発現系は、効果的なリボザイム発現カセットの設計を容易にする。

【0043】tRNA^{Val}-リボザイムの核から細胞質への輸送

図1A~1Cに示すリボザイム発現カセットは、すべての転写物が細胞質 (ここで転写物はその標的を見いだすことができる) に輸送されるのを可能とした (図7A)。そして、リボザイムによる標的分子の発現の有意な抑制が観察された (図4および6C)。以前の研究 (Bertrandら, 1997) において、成熟 tRNA^{Val} の最後の10塩基の欠失は3' 末端プロセッシングをブロックしただけでなく、転写物の細胞質への輸送を阻害した (Tobianら, 1985)。これらの結果は、3' 末端プロセッシングが細胞質への輸送と結びついている可能性があること、および3' 末端が変更された転写物は効率的に輸送されないことを示唆した (CottenおよびBirstiel, 1989; Bodelensら, 1995)。しかし、図7に示されるように、成熟 tRNA^{Val} の最後の7塩基の欠失は、転写物の核からの輸送を抑制しなかった。

【0044】tRNAを核から細胞質へ輸送するExportin(tRNA) と称するタンパク質が最近同定された (Artsら, 1998)。Exportin(tRNA) は tRNA の不在下で RanGTP と結合する。しかし、これは RanGTP の不在下では tRNA と結合しない。したがって、下記の tRNA 輸送モデルが提案された。すなわち、まず核内で Exportin(tRNA) が RanGTP と会合し、次にこの複合体が成熟した tRNA に結合するというものである。この最終的な複合体は、核膜孔複合体をへて細胞質に運ばれる。そこで Ran 結合 GTP は加水分解されて tRNA を細胞質中に放出し、Exportin(tRNA) を核にもどしてリサイクルさせる (Artsら, 1998)。Exportin(tRNA) によって認識される tRNA 中の最小配列または構造はいまだに分かっていない。しかし、図1A~1Cに示すリボザイムは細胞質にうまく輸送されたので、天然の tRNA の3' 末端における欠失および変更にもかわらず、これらのリボザイムが Exportin(tRNA) によって認識され、輸送されたという

ことが考えられる。

【0045】我々の研究から、3' 末端変更 tRNA 転写物はその二次構造が図1A~1Cに示すものと類似しているならば、細胞質へ効率的に輸送されることが明らかである。別の種類のリボザイム (図1DのRz4 (配列番号5)) を HeLa 細胞で発現させようと同等の実験を行なった際、転写物は核内に残った (図7C)。転写物 Rz1~Rz4 においてはAおよびBボックスプロモーターエレメント (図1の影をつけてある部分) のみならず、tRNA^{Val} セグメント内の残りのすべての配列が同一であるという事実にもかかわらず、Rz4 (図1D) の二次構造は細胞質リボザイム Rz1、Rz2 および Rz3 のそれと全く異なっている。この観察は、もし Exportin(tRNA) が実際にリボザイム転写物を認識するのであれば、Exportin(tRNA) は特定のヌクレオチド配列を認識するのではなさそう、ということを示唆する。Exportin(tRNA) はむしろ tRNA の何らかの特異的高次構造、またはそのような高次構造内の何らかの配列を認識するのかもしれない。

【0046】実際、別の目的のために構築した、二次構造が Rz4 のそれと類似している別のリボザイムは核内にのみ見いだされた (データは示していない)。我々は別の3種類の遺伝子を抑制するために、10種類以上の別のリボザイムを構築した。構築にあたっては、それらが細胞質へ輸送されるように、二次構造を図1の Rz1 から Rz3 の二次構造に似たもののようにと留意し、リンカー配列を調節した。これらのリボザイムのすべては、転写後、細胞質中に見いだされた。これらは高い活性 (>95%抑制) のみならず、高い特異性 (不活性対照による抑制は<5%) をもっていた。したがって、図1A~1Cに示す設計に基づく細胞質リボザイムは非常に魅力的に思われる (Kawasakiら, 1996, 1998)。核内に残留し、活性がそれほど高くなかった Rossi の tRNA^{Met}-リボザイム (Bertrandら, 1997) は、リンカー配列が異なるため、我々の活性な二次構造とは類似していないということも述べておくべきであろう。それらの構造は Rz4 のそれに類似している (コンピュータによって予測された構造はここには示していない)。

【0047】Rz4 または Rossi の tRNA^{Met}-リボザイムのようなものではなく Rz1 から Rz3 のようなリボザイムが RanGTP の存在下で (すなわち、輸送受容体とその貨物の間で複合体の形成が予想されるような条件下で)、Exportin(tRNA) と複合体を形成するかどうかを決定することは興味深いであろう (Artsら, 1998)。

【0048】in vivo における tRNA^{Val}-リボザイムの活性。

Sullenger および Cech (1993) ならびに Rossi のグループ (Bertrandら, 1997) は、リボザイムのその標的細胞内共局在の重要性を明確に示した。1つの特定の発現カセットの場合、リボザイムとその標的 tRNA の両方が核内

に見いだされ、そしてリボザイムによる標的の特異的切断が検出された(Bertrandら, 1994)。したがって、決定的なパラメーターはリボザイム自体の局在ではなく、むしろ標的と共局在するリボザイムの能力である(Bertrandら, 1997)。mRNAの細胞内アロセンシングおよび輸送には種々のタンパク質因子が関与している、そしてそのような因子は転写直後にmRNAと迅速に結合するので、このような因子は核内におけるリボザイムの標的RNAとの結合を阻害するであろう。また細胞質中においても、ポリソームがリボザイムの標的RNAとの結合を阻害するかもしれない。さらに、核mRNA^{Met}-リボザイムは、もとは核内で産生された細胞質mRNAを不活性化しなかった(DeBertrandら, 1997)、核から細胞質へのmRNAの輸送は核mRNA^{Met}-リボザイムによる攻撃よりもはるかに迅速であるように思われる。in vivoにおけるリボザイムの活性を決定する最も重要な因子の1つは、リボザイムとその標的との会合であると思われる。リボザイムの相当多くの部分が輸送中および標的部位への接近中に分解されない。このため、リボザイムとその標的が共局在している、それだけではリボザイムのin vivoにおける効果を保証しない。

【0049】in vivoにおいて最も安定であったリボザイムRz2 (図3B、3C、6Aおよび6B)は、in vitroにおいてより高い切断活性を示したRz3 (図2)よりも細胞内環境においてより効果的であった(図4)。活性におけるこの差はHIV-1チャレンジにおいて拡大された(図6C)。より安定なRz2を産生する細胞はHIV-1の感染に対してほぼ完全に感受性であったが、安定性のより低いRz3を産生する他の細胞はHIV-1の感染に対して対照細胞と同程度に感受性であった。Rz2の半減期はRz3のそれの約2倍であったが、どの構造的特徴がRz2をRNaseに対してより耐性になっているのか、現在のところ不明である。Rz2に較べて、Rz3のリンカー内には6個多いヌクレオチドが含まれていた。このことが高次構造に影響を及ぼしたに相違ない。

【0050】天然のtRNA分子の半減期は50~60時間であるが(SmithおよびWeinberg, 1981)、Rz2の半減期は約100分に過ぎなかった。tRNA-リボザイムの半減期を伸ばすことができるならば、より高い抑制効果が期待できるであろう。我々は転写物のin vivoにおける相対的安定性をいまだに予測できないのであるが、図1に示すような二次構造を組み込むことによって細胞質に輸送されるリボザイムを設計することは可能である。転写物の安定性を正確に予測することができないので、我々は通常数個の構築体を試験する。そして、今日までに試験した種々の遺伝子の場合、我々は興味のある遺伝子の発現を>95%の効率で不活性化できるカセットを常に見つけることができた(Kawasakura, 1996, 1998)。

【0051】tRNA^{Val}-ベクターは、標的分子が細胞

質中に局在するリボザイム以外の機能性RNAの発現に有用でありうる。我々の掌中で、tRNA^{Val}-リボザイムは少なくとも培養細胞中では一貫して高い活性を有する。したがって適切に設計されたtRNA^{Val}-リボザイムは、分子生物学における道具として、また医学分野においても役に立つ道具として有用である。

【0052】

【発明の効果】本発明により、新規なリボザイムおよびその発現系が提供された。本発明のリボザイムはin vivoで安定性が高く、それにより高い活性を呈する。

【0053】(参考文献) Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. and Martin, M. A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman celltransfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.*, 59, 284-291.

Adeniyi-Jones, S., Romeo, P. and Zasloff, M. (1984) Generation of longread through transcripts in vivo and in vitro by deletion of 3' termination and processing sequences in the human tRNA^{Met} gene. *Nucleic Acids Res.*, 12, 1101-1115.

【0054】Arnold, G. J., Schmutzler, C., Thomann, U., van Tol, H. and Gross, H. J. (1986) The human tRNA^{Val} gene family: organization, nucleotide sequences and homologous transcription of three single-copy genes. *Gene*, 44, 287-297.

Arts, G.-J., Fornerod, M. and Mattaj, I. W. (1998) Identification of nuclear export receptor for LRNA. *Curr. Biol.*, 6, 305-314.

【0055】Bertrand, E., Pictet, R. and Grange, T. (1994) Can hammerhead ribozymes be efficient tools for inactivating gene function? *Nucleic Acids Res.*, 22, 293-300.

Bertrand, E. and Rossi, J. J. (1996) Anti-HIV therapeutic hammerhead ribozymes: targeting strategies and optimization of intracellular function. In Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. (eds.), *Nucleic Acids Mol. Biol.*, Vol. 10. Springer-Verlag, Berlin, 301-313.

【0056】Bertrand, E., Castanotto, D., Zhou, C., Carbonnelle, C., Lee, G. P., Chatterjee, S., Grange, T., Pictet, R., Kohn, D., Engelke, D. and Rossi, J. J. (1997) The expression cassette determined the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA*, 3, 75-88.

Boelens, W., Palacios, I. and Mattaj, I. W. (1995) Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. *RNA*, 1, 273-283.

【0057】Cotten, M. and Birnstiel, M. (1989) Rib

- zyme mediated destruction of RNA in vivo. *EMBO J.*, 8, 3861-3866.
- Dahn, S. C. and Uhlenbeck, O. C. (1991) Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry*, 30, 9464-9469.
- Dahn, S. C., Derrick, W. B. and Uhlenbeck, O. C. (1993) Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead RNA cleavage mechanism. *Biochemistry*, 32, 13040-13045.
- Dropulic, B., Lin, N. H., Martin, M. A. and Jeang, K. T. (1992) Functional characterization of a U5 ribozyme: intracellular suppressor of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J. Virol.*, 66, 1432-1441.
- [0058] Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. (ed. s.) (1996) *Catalytic RNA. Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 10. Springer-Verlag, Berlin.
- Erickson, R. P. and Izant, J. (eds.) (1992) *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*; Raven Press, New York.
- Fefbeyre, G., Bratty, J., Chen, H. and Cedergren, R. (1996) Cell cycle arrest trans-hammerhead ribozyme action in Yeast. *J. Biol. Chem.*, 271, 19328-19323.
- Fujita, S., Koguma, T., Ohkawa, J., Moti, K., Kohda, T., Kise, H., Nishikawa, S., Iwakura, M. K. and Taira, K. (1997) Discrimination of a single base change in a ribozyme using the gene for dihydrofolate reductase as a selective marker in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 391-396.
- [0059] Gebhard, J. R., Perry, G. M., Mahadevi, S. and Witton, J. L. (1997) Use of a nonviral vector to express a chimeric tRNA-ribozyme against myxomatous choriomeningitis virus: cytoplasmic accumulation of acatalytically competent transcript but minimal antiviral effect. *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.*, 7, 3-11.
- Good, P. D., Krikos, A. J., Li, S. X. L., Lee, N. S., Giver, L., Ellington, A., Zaia, J. A., Rossi, J. J. and Engelke, D. R. (1997) Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Therapy*, 4, 45-54.
- Guerrier-Takade, G., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35, 849-857.
- [0060] Hamblet, N. S. and Castora, F. J. (1995) Mitochondrial DNA deletion analysis: a comparison of PCR quantitative methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 839-847.
- Hasseloff, J. and Gerlach, W. L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 334, 585-591.
- Huang, Y. and Carmichael, G. G. (1996) Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1534-1542.
- [0061] Inokuchi, Y., Yuyama, N., Hirashima, A., Nishikawa, S., Ohkawa, J., and Taira, K. (1994) A hammerhead ribozyme inhibits the proliferation of an RNA coliphage SP in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 269, 11361-11366.
- Ilves, H., Barske, C., Junker, U., Bohnlein, E. and Veres, G. (1996) Retroviral vectors designed for targeted expression of RNA polymerase III-driven transcripts: a comparative study. *Gene*, 171, 203-208.
- Jennings, P. A. and Molloy, P. L. (1987) Inhibition of SV40 replicon function by engineered antisense RNA transcribed by RNA polymerase III. *EMBO J.*, 6, 3043-3047.
- [0062] Kawasaki, H., Ohkawa, J., Tanishige, N., Yoshinari, K., Murata, T., Yokoyama, K. K. and Taira, K. (1996) Selection of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300 kDa protein (p300) and luciferase. *Nucleic Acids Res.*, 24, 3010-3016.
- Kawasaki, H., Ecker, R., Yao, T.-P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M. and Yokoyama, K. K. (1998) Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic acid-induced C9-cell differentiation. *Nature*, 393, 284-289.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, 31, 147-157.
- [0063] Lott, W. B., Pontius, B. W. and von Hippel, P. H. (1998) A two-metal ion mechanism operates in the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of an RNA substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 542-547.
- Murray, J. A. H. (ed.) (1992) *Antisense RNA and DNA*; Wiley-Liss, Inc., New York.
- Ohkawa, J., Yuyama, N., Takebe, Y., Nishikawa, S. and Taira, K. (1993) Importance of independence in ribozyme reactions: kinetic behavior of trimmed and of simply connected multiple ribozymes with potential activity against human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11302-11306.
- [0064] Ojwang, J. O., Hampel, A., Looney, D. J., Wong-Staal, F. and Rappaport, J. (1992) Inhibition

- on of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10802-10806.
- Ozawa, T., Tanaka, M., Ikebe, S., Ohno, K., Kondo, T. and Mizuno, Y. (1990) Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in parkinsonian striatum by a kinetic PCR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 483-489.
- [0065] Perriman, R., Bruening, G., Dennis E. S. and Peacock, W. J. (1995) Effective ribozyme delivery in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6175-6179.
- Pontius, B. W., Lott, W. B. and von Hippel, P. H. (1997) Observations on catalysis by hammerhead ribozymes are consistent with a two-divalent-metal-ion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2290-2294.
- Prisley, S., Buonomo, S. B. C., Michienzi, A. and Bozzoni, I. (1997) Use of adenoviral VA1 small RNA as a carrier for cytoplasmic delivery of ribozymes. *RNA*, 3, 677-687.
- [0066] Rossi, J. J. and Sarver, N. (1990) RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. *TIBTECH*, 8, 179-183.
- Rossi, J. J. (1995) Controlled, targeted, intracellular expression of ribozymes: progress and problems. *TIBTECH*, 13, 301-306.
- Sarver, N., Cantin, E. M., Chang, P. S., Zaida, J. A., Ladne, P. A., Stepenes, D. A. and Rossi, J. J. (1990) Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 247, 1222-1225.
- [0067] Scanlon, K. J. (ed.) (1997) *Therapeutic Applications of Ribozymes; Methods in Molecular Medicine*, Vol. 11, Humana Press, New Jersey.
- Shimada, T., Fujii, H., Mitsuya, H. and Niehuis, A. W. (1991) Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *J. Clin. Invest.*, 88, 1043-1047.
- Smith, D. W. and Weinberg, W. C. (1981) Transfer RNA in reticulocyte maturation. *Biochem. Biophys. Acta*, 655, 195-198.
- [0068] Sullenger, B. A., Lee, T. C., Smith, C. A. and Ungers, G. E. (1990) Expression of chimeric tRNA-driven antisense transcripts renders NIH 3T3 cells highly resistant to Moloney murine leukemia virus replication. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6512-6523.
- Sullenger, B. A. and Cech, T. R. (1993) Tethering ribozymes to retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science*, 262, 1566-1569.
- [0069] Taira, K., Nakagawa, K., Nishikawa, S. and Furukawa, K. (1991) Construction of a novel RNA-trimscript-trimming plasmid which can be used both in vitro in place of run-off and (G)-free transcription and in vivo as a multiple sequence transcription vectors. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5152-5130.
- Thomas, K. R. and Capecechi, M. R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51, 503-512.
- [0070] Thompson, D. J., Ayers, F. D., Malmstrom, A. T., Ganousis, L. M., Chourira, M. B., Couture, L. and Stinchcomb, T. D. (1995) Improved accumulation and activity of ribozymes expressed from a tRNA-based RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.*, 23, 2259-2268.
- Tobian, J. A., Drinkard, L. and Zaslouff, M. (1985) tRNA nuclear transport: defining the critical regions of human tRNA Met by point mutagenesis. *Cell*, 43, 415-422.
- Turner, P. C. (ed.) (1997) *Ribozyme Protocols; Methods in Molecular Biology*, Vol. 74, Humana Press, New Jersey.
- [0071] Uhlenbeck, O. C. (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, 328, 596-600.
- Yamada, O., Kraus, G., Leavitt, M. C., Yu, M. and Wong-Staal, F. (1994) Activity and cleavage site specificity of an anti-HIV-1 hairpin ribozyme in human T cells. *Virology*, 205, 121-126.
- Yamada, O., Yu, M., Yee, J.-K., Kraus, G., Looney, D. and Wong-Staal, F. (1994) Intracellular immunization of human T cells with a hairpin ribozyme against

nst human immunodeficiency virus type 1. Gene Ther
apy, 1, 38-45.

[0072] Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3806-3810.

Yu, M., Ojwang, J. O., Yamada, O., Hmapel, A., Rapaport, J., Looney, D. and Wong-Staal, F. (1993) A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-6344.

[0073] Zhao, J. J. and Picot, K. (1993) Generating loss-of function phenotypes of the fushitarazu gene with a targeted ribozyme in

n Drosophila. Nature, 365, 448-451.

Zhou, D.-M., Zhang, L.-H., Kumar, P. K. R. and Taira, K. (1996) The ribozyme mechanism revisited: Evidence against direct coordination of a Mg^{2+} ion with the pro-Roxygen of the scissile phosphate in the transition state of a hammerhead ribozyme-catalyzed reaction. J. Am. Chem. Soc., 118, 8969-8970.

[0074] Zhou, D.-M., Zhang, L.-H. and Taira, K. (1997) Explanation by the double-metal-ion mechanism of catalysis for the differential metal ion effects on the cleavage rates of 5'-oxy and 5'-thio substrates by a hammerhead ribozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 14343-14348.

Zhou, D.-M. and Taira, K. (1998) The hydrolysis of RNA: from theoretical calculations to the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of RNA. Chem. Rev, 98, 991-1026.

[0075]
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Expression Systems for Transcription of Functional Nucleic Acids

<130> 117F0059

<140>

<141>

<160> Z3

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 136

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide sequence of Rz2

<400> 1
 accguugguu uccguagugu agugguuau acguucgccu aacacgcgaa aggucccccg 60
 uucgaaaccg ggcacuaaca acacaacacu gaugaggacc gaaagguccg aaacgggcac 120
 gucgaaacg guuuuu 136

<210> 2
 <211> 142
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
 sequence of Rz3

<400> 2
 accguugguu uccguagugu agugguuau acguucgccu aacacgcgaa aggucccccg 60
 uucgaaaccg ggcacuaaca accaacaacac aacacugaug aggacccgaaa ggucggaac 120
 ggscacugcg gaaacgguuu uu 142

<210> 3
 <211> 128
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
 sequence of Rz1

<400> 3
 accguugguu uccguagugu agugguuau acguucgccu aacacgcgaa aggucccccg 60
 uucgaaaccg ggcacccaca caacacugau gaguccguga ggacgaaacg ggcaccucga 120
 gcgcuuuu 128

<210> 4
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
 sequence of the transcript of human placental tRNA^{phe}

<400> 4
 accguugguu uccguagugu agugguuau acguucgccu aacacgcgaa aggucccccg 60
 uucgaaaccg ggcggaaca aagacagucg cuuuu 95

<210> 5
 <211> 149
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide sequence of Rz4

<400> 5

accguuguu uccguagugu aguguuuau acguugccu aacacgcga agguccccc 60
uucgaaaccg ggcacccggg ugccugucac cgaagugcu uuccggucuc augaguccu 120
gaggcgaaa cagccacucg agccuuuu 149

<210> 6

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence of a sense oligonucleotide linker

<400> 6

aattcaggac tagtcttita ggtcaaaaag aagaagcttt gtaaccgttg gtttccgtag 60
tgtagtggtt atcacgttcg cctaaccgcg gaaagtcgc cggttcgaag 110

<210> 7

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence of an antisense oligonucleotide linker

<400> 7

tgcacttcga accggggacc ttctcgtgt tagcgaacg tgataaccac tacatacgg 60
aaaccaacgg ttacaaagct tcttctctt ttgacctaa aagactagtc ctg 113

<210> 8

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence of a sense oligonucleotide linker

<400> 8

cgaaaccggg caccggggga atataacctc gacgcgttt ttctatcgc gtc 53

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an antisense oligonucleotide linker

<400> 9

tcgacgcgat agaaaaaag cgctcgaggt tataticccc gggtgccggg tttc 54

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper primer

<400> 10

cgccagggtt tccagtcac gac 23

<210> 11

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of R21
and a terminator

<400> 11

ctgcagctcg acgcgataga aaaaaagcgc tcgaggtgcc cgttcgtccc tcacggacgc 60
atcagtggtg tctggtgtgcc cgttttcgaa ccgggacctt t 101

<210> 12

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of R22
and a terminator

<400> 12

ctgcagctcg acgcgataga aaaaaaccgt ttccgacgtg cccgtttcgg tccattcggt 60
cctcatcagt gtctgtgttg tagtgcgcgg ttccgaacgg gggacctt 109

<210> 13

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of R23
and a terminator

<400> 13

ctgcagtcg acgcgataga aaaaaccgt ttccgacgtg cccgtttcgg tcctcatcag 60
tgttgtgtg ttgtttgtag tgcccggtt cgaaccggg accttt 106

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the reference RNA

<400> 14

aaatcctat aaaaagcgt cgaggttatg ctccccgggt 40

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the ribozyme

<400> 15

ctcatctgtg ttgtgt 16

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a primer for b-actin

<400> 16

gtggccatct ctgtcgcgaa 20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a primer for the ribozyme

<400> 17

gacatttcgg tcttcac

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper oligonucleotide primer

<400> 18

gactacctca tgaagatcct

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower oligonucleotide primer

<400> 19

gtggccatct ctgtctcgaa

20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper oligonucleotide primer

<400> 20

gttatcacgt tcgectaa

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower oligonucleotide primer

<400> 21
gacatttcgg tctctatc

18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the ribozyme

<400> 22
acgcgaaagg tccccgt

18

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for b-actin

<400> 23
gcgggaaat cgtgcgtga

19

【0076】
【配列表フリーテキスト】

【0077】
【配列番号1】配列番号1の配列はRz 2の塩基配列である。

【0078】
【配列番号2】配列番号2の配列はRz 3の塩基配列である。

【0079】
【配列番号3】配列番号3の配列はRz 1の塩基配列である。

【0080】
【配列番号4】配列番号4の配列はヒト胎盤もRNA
Valの転写物の塩基配列である。

【0081】
【配列番号5】配列番号5の配列はRz 4の塩基配列である。

【0082】
【配列番号6】配列番号6の配列はセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0083】
【配列番号7】配列番号7の配列はアンチセンスオリゴ

ヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0084】
【配列番号8】配列番号8の配列はセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0085】
【配列番号9】配列番号9の配列はアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0086】
【配列番号10】配列番号10の配列はアッパープライマーの塩基配列である。

【0087】
【配列番号11】配列番号11の配列はRz 1とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

【0088】
【配列番号12】配列番号12の配列はRz 2とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

【0089】
【配列番号13】配列番号13の配列はRz 3とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

【0090】

【配列番号14】配列番号14の配列は参照RNAに特異的なプロンプの塩基配列である。

【0091】

【配列番号15】配列番号15の配列はリボザイムに特異的なプロンプの塩基配列である。

【0092】

【配列番号16】配列番号16の配列は β -アクトニン用のプライマーの塩基配列である。

【0093】

【配列番号17】配列番号17の配列はリボザイム用のプライマーの塩基配列である。

【0094】

【配列番号18】配列番号18の配列はアッパーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0095】

【配列番号19】配列番号19の配列はローアオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0096】

【配列番号20】配列番号20の配列はアッパーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0097】

【配列番号21】配列番号21の配列はローアオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0098】

【配列番号22】配列番号22の配列はリボザイムに特異的なプロンプの塩基配列である。

【0099】

【配列番号23】配列番号23の配列は β -アクトニンに特異的なプロンプの塩基配列である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、コンピュータフォールディングによって予測されたtRNA^{Val}-リボザイムの二次構造を示す。ハンマーヘッド型リボザイムの配列(太い大文字)を種々のリンカー配列を介してtRNA^{Val}配列(大文字)の下流に連結した。7塩基欠失tRNA^{Val}の内部プロモーターに対応する配列、すなわちAおよびBボックスは影を付けて囲って示してある。図A~Dは、それぞれtRNA^{Val}-リボザイム1(Rz1)、2(Rz2)、3(Rz3)および4(Rz4)の二次構造を示す。リボザイムの認識アームを下線をつけて示す。図Eはヒト胎盤tRNA^{Val}の転写物の二次構造を示す。tRNAは3つの部位(矢じりのマーク)でプロセシングされ、成熟tRNA^{Val}(大文字)を生じる。

【図2】図2は、in vitroにおけるtRNA^{Val}-リボザイムによって媒介される切断を示す。パネルAは基質RNAを模式的に表す。(基質RNAはpNL432のヌクレオチド第500~711、すなわちHIV-1 RNAのU5領域に対応する。)この基質RNAはtRNA^{Val}-リボザイムによって2個の断片に切断された(5'切断産物: 70量体; 3'

切断産物: 156量体)。パネルBは切断反応の結果を示すオートラジオグラムである。レーン: M - マーカー; ベクター - リボザイムをもたないtRNA^{Val}ベクター単独; Rz1 - リボザイム1; Rz2 - リボザイム2; およびRz3 - リボザイム3。

【図3】図3は、in vivoにおけるtRNA^{Val}-リボザイムの安定性を示す。パネルAは、参照遺伝子の使用によりトランスフェクション効率の標準化を可能としたpUC-Rzを模式的に表す。参照遺伝子はリボザイム発現カセットの下流で発現された。2つの発現カセットにおいて、プロモーターおよびターミネーターの配列はそれぞれ同一であった。パネルBはtRNA^{Val}-リボザイムの発現の定常レベルを示す。図はリボザイムに特異的なプロンプ(上)および参照遺伝子に特異的なプロンプ(下)を用いたノーザンブロット分析を示す。図Cは、安定にリボザイムを導入した細胞におけるtRNA^{Val}-リボザイムの半減期を示す。図中、○はtRNA^{Val}-リボザイム1(Rz1)の相対量を示す。□および◇は、それぞれtRNA^{Val}-リボザイム2(Rz2)および3(Rz3)の相対量を示す。横棒は3回のアッセイによる結果のS.E.を示す。

【図4】図4は、HeLa細胞におけるU5 LTR-リボザイム融合遺伝子の産生抑制。パネルA、HeLa細胞における一過性発現。標的発現プラスミドおよびリボザイムをコードするpUCdt-Rzの両方を用いてHeLa細胞を同時トランスフェクションした。パネルB、安定にリボザイムを導入した細胞における一過性発現。各構築物につき、挿入遺伝子(tRNA^{Val}またはtRNA^{Val}-リボザイム)の転写物のレベルが類似している2つの独立したクローンを選択した。リボザイム産生HeLa細胞のトランスフェクションには、標的発現プラスミドのみを用いた。横棒は5回のアッセイによる結果のS.E.を示す。

【図5】図5は、HIVベクターの模式的表示である。各tRNA^{Val}-リボザイムのための発現カセットを、HIV-1由来ベクター(A)のTK-neo^rのすぐ上流に位置するSalI部位に挿入し、tRNA^{Val}-リボザイムをコードするレトロウイルスベクターHIV-Ribo.N(B)を得た。Ψはパッケージングシグナルを示す。

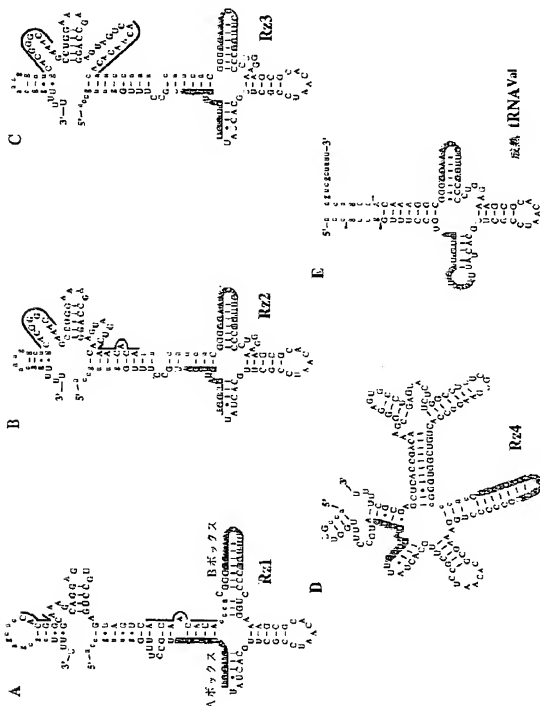
【図6】図6は、安定にリボザイムを導入したH9細胞(CD4⁺ T細胞)におけるtRNA^{Val}-リボザイム発現の定量化、および上記導入細胞におけるp24産生の抑制を示す。パネルA、リボザイム導入H9細胞の2個の独立したクローン由来のRT-PCR増幅リボザイムのサザンブロット分析の結果(図Bに示す)の定量化。13、15および17サイクル後のPCR産物を、³²P標識オリゴヌクレオチドプロンプを用いてサザンブロットティングにより分析した。図中、四角および丸はそれぞれリボザイム2(Rz2)およびリボザイム3(Rz3)を導入した細胞を用いた結果を示す。パネルB、サザンブロットティングの結果。パネルC、HIV-1 NL432を感染させた後、細胞を1

1日間培養した。3、7および11日に各培養物から少量の上清を調製した。HIV-1抗原捕捉ELISAによりp24抗原のレベルを測定した。図中、三角は tRNA^{Val} -リボザイム1 (Rz1) の結果を示す。四角および丸はそれぞれリボザイム2 (Rz2) およびリボザイム3 (Rz3) の結果を示す。三角は対照細胞を用いた場合の結果を示す。

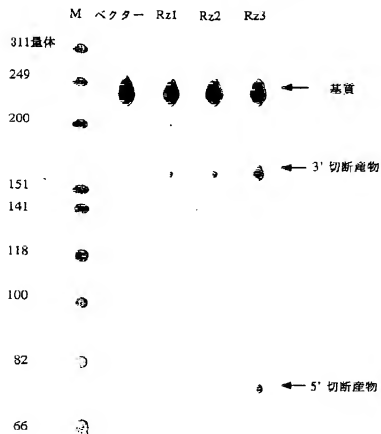
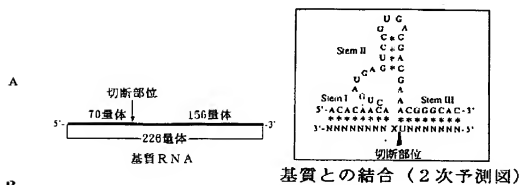
【図7】図7は、 tRNA^{Val} -リボザイムの細胞内局在を示す。各細胞内画分由来のRNAを用いてノーザンブ

ロット分析を実施した。リボザイム遺伝子を安定に導入した細胞 (図4 Bに結果を示す実験に用いた tRNA^{Val} -リボザイム産生HeLa細胞) から核RNAおよび細胞質RNAを別々に調製した。パネルAおよびCは、 tRNA^{Val} -リボザイムに特異的な ^{32}P 標識プローブを用いて得た結果を示す。BおよびDは対照を示す。天然のU6遺伝子の転写物に特異的なプローブを用いて、細胞質画分の汚染を調べた。

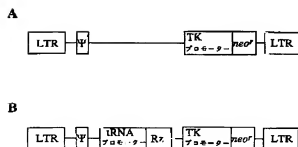
【図1】



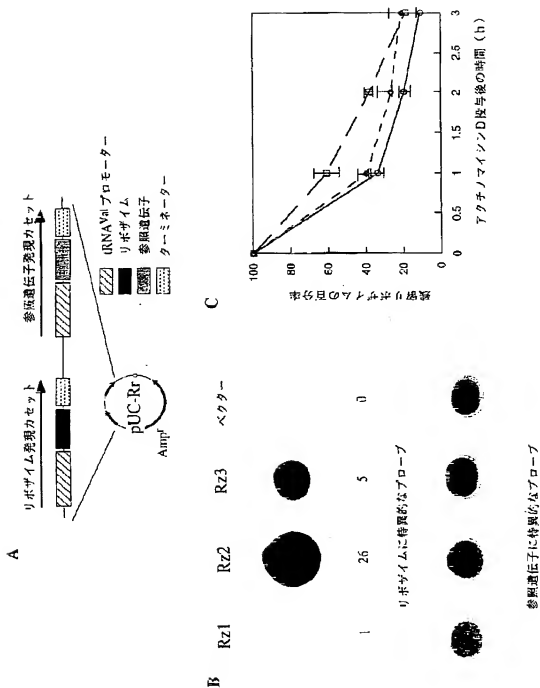
【図2】



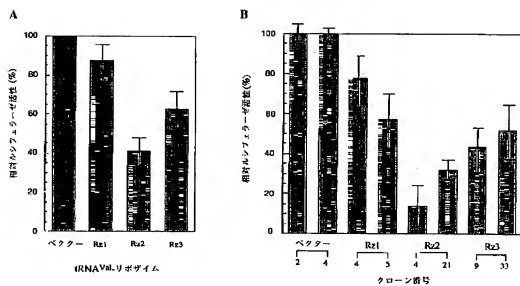
【図5】



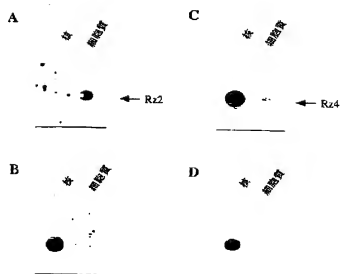
【図3】



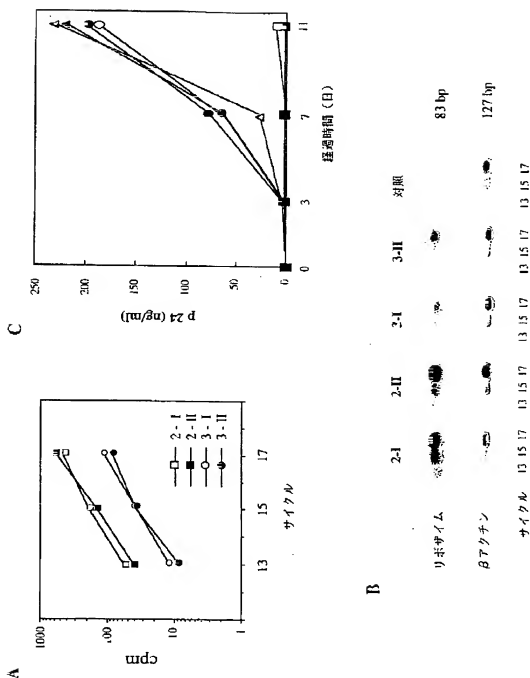
【図4】



【図7】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成11年7月19日(1999. 7. 19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項4】 下記の塩基配列(1)を持つヌクレオチド・

配列を含むリボザイムまたは該リボザイムをコードするDNAを含む発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物。

塩基配列(1): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUACGUUCGCCUAAACACGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACAAACACUGAUGAGGACCGAAGGUCCGAACGGGACGUCGGAACGGUUU-3'

フロントページの続き

(72)発明者 小関 しおり

茨城県つくば市東1-1-4 工業技術院
産業技術融合領域研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA11 GA13 GA18
HA08

4C084 AA13 NA05 NA06 NA07 ZC552

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
ZC55

4C087 AA01 AA02 AA03 CA12 NA05
NA06 NA07 ZC55